

PCT/JP2004/011480

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

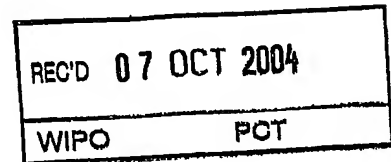
13.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    8 月 1 4 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 2 9 3 5 5 3  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 3 - 2 9 3 5 5 3 ]



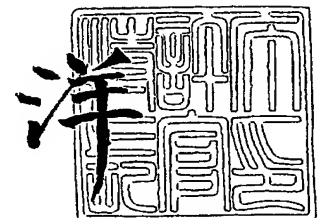
出 願 人                      タカラバイオ株式会社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年    9 月 2 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 0 8 5 7 5 0

【書類名】 特許願  
【整理番号】 T-1847  
【提出日】 平成15年 8月14日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
C12N 9/22

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内  
【氏名】 佐川 裕章

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内  
【氏名】 友野 潤

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内  
【氏名】 上野 はるみ

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内  
【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】  
【識別番号】 302019245  
【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社  
【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 173212  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

dsRNA 分解活性を有するタンパク質であって、dsRNA に作用して特定の長さの dsRNA を生成する活性を有することを特徴とする dsRNA 分解活性を有するタンパク質。

**【請求項 2】**

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、Dicer の機能ドメインを有することを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質。

**【請求項 3】**

Dicer の機能ドメインが、RNase IIIa、b ならびに dsRNA 結合ドメインからなることを特徴とする請求項 2 記載のタンパク質。

**【請求項 4】**

特定の長さの dsRNA が、約 15～30 塩基対の dsRNA であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

**【請求項 5】**

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号 4 記載のアミノ酸配列あるいは配列表の配列番号 3 記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

**【請求項 6】**

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号 4 記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

**【請求項 7】**

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 分解活性を有するタンパク質の製造方法であって、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることを特徴とする dsRNA 分解活性を有するタンパク質の製造方法。

**【請求項 8】**

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有するキット。

**【請求項 9】**

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で dsRNA に dsRNA 分解活性を有するタンパク質を作用させ、特定の長さの dsRNA を生成することを特徴とする dsRNA の分解方法。

**【請求項 10】**

核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質が融合タンパク質であることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

**【請求項 11】**

核酸結合活性を有するタンパク質が、RNA 結合活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 9 又は 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

RNA 結合活性を有するタンパク質がコールド ショック プロテインであることを特徴とする請求項 11 記載の方法。

**【請求項 13】**

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴とする請求項 12 記載の方法。

**【請求項 14】**

コールド ショック プロテインがサーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B であることを特徴とする請求項 13 記載の方法。

**【請求項 15】**

特定の長さの dsRNA が、約 15～30 塩基対の dsRNA であることを特徴とする請求項 9～14 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 16】

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質であることを特徴とする請求項 9～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、天然型 Dicer あるいはその機能的同等物であることを特徴とする請求項 9～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で RNA 合成活性を有するタンパク質を用いて RNA 合成反応を行うことを特徴とする RNA の合成方法。

【請求項 19】

核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を用いることを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

核酸結合活性を有するタンパク質が、コールド ショック プロテインであることを特徴とする請求項 18 又は 19 記載の方法。

【請求項 21】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴とする請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

コールド ショック プロテインが、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B であることを特徴とする請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

RNA 合成活性を有するタンパク質が、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 18～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 9～17 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びに dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 25】

請求項 9～17 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキット。

【請求項 26】

請求項 18～23 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 27】

請求項 18～23 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキット。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】 dsRNA分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質を用いた dsRNA分解方法ならびに RNA合成方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、特定の長さの dsRNA を生成する活性を有する、 dsRNA 分解活性を有するタンパク質、当該タンパク質と核酸結合活性を有するタンパク質、例えば RNA 結合活性を有するタンパク質を組み合わせた dsRNA の効率的な分解方法並びに核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を組み合わせた RNA の効率的な合成方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

最近、低分子 dsRNA を利用する遺伝子工学的手法が報告されている。

例えば、RNA 干渉 (RNAi: RNA interference) は、dsRNA によってその配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子発現が抑制される現象である。dsRNA によって遺伝子サイレンシングができることがわかった発端は、線虫におけるアンチセンスを用いた研究からであった。1995年、Guo と Kempfues は par-1 と呼ばれる遺伝子をアンチセンス RNA で抑制する実験を行なった。アンチセンス RNA を加えると、予想通り par-1 の発現を抑制したが、驚いたことに、コントロールとして用いたセンス RNA も同様に par-1 の発現を抑制し、par-1 変異株の表現形を示した。(例えば、非特許文献1)

この矛盾は、1998年に Fire らによって解き明かされた。アンチセンス RNA とセンス RNA を、それぞれ RNA ポリメラーゼを用いて合成するとき、わずかに非特異的に逆向きの RNA ができてしまう。そのコンタミネーションによってできる dsRNA が遺伝子サイレンシングの本体であり、アンチセンス RNA およびセンス RNA は遺伝子の発現を抑制できないこと、またアンチセンス RNA とセンス RNA をアニールさせた dsRNA が効率よく遺伝子の発現を抑制できることが明らかとなった。(例えば、非特許文献2)

## 【0003】

上記 RNA 干渉においては、Dicer と呼ばれる酵素が dsRNA から小分子の RNA (siRNA: short interfering RNA) を生成させる。(例えば、非特許文献3)

この酵素の作用により生じた siRNA は、RISC (RNA induced silencing complex) と呼ばれる複合体に取り込まれ、該複合体が標的 mRNA を認識し、分解すると考えられている。しかしながら、RNA 干渉に関与すると考えられる各因子についての正確な機能についてはまだまだ未知の部分が多いのが現状であった。(例えば、非特許文献4)

## 【0004】

上記 RNA 干渉を効率よく行うためには、dsRNA ならびに siRNA を効率よく生成させることが重要である。上記 Dicer としてはヒト由来 Dicer (例えば、非特許文献5) が例示され、さらにリコンビナント Dicer (例えば、非特許文献6) がジーンセラピーシステムズ社あるいはストラタジーン社より販売されている。

しかしながら、上記のようなリコンビナント Dicer については、本来の酵素学的な性能を十分に発揮しているかどうかについては詳細に検討されていない。また、上記 Dicer の少なくともどのドメインを含有すれば、dsRNA に作用させて好適な dsRNA (siRNA) を生成させる活性を保持することができるか、さらにその遺伝子工学的な生産性を向上できるかについては知られていない。

さらに、dsRNA を効率よく生成させる方法についても特に有効な方法は知られていないのが現状であった。

## 【0005】

さらに、RNAポリメラーゼを用いて合成した約21ヌクレオチドの鎖長のdsRNAをそのままsiRNAとして利用する方法も報告されている（例えば、非特許文献7）。従って、RNAが効率よくできる方法があれば上記方法にも利用できる。

【0006】

【非特許文献1】Guo S. 他1名 Cell 1995年 vol. 81、p611-620

【非特許文献2】Fire A. 他5名 Nature 1998年 vol. 39、p806-811

【非特許文献3】Bernstein E. 他3名 Nature 2001年 vol. 409、p363-366

【非特許文献4】Tabara H. 他3名 Cell 2002年 vol. 109、p861-871

【非特許文献5】Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p5875-5885

【非特許文献6】Myers J. W. 他3名 Nature biotechnology 2003年 vol. 21、p324-328

【非特許文献7】Donze O. 他1名 Nucleic Acids Research 2002年 vol. 30, No. 10, e46

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質の提供、RNA干渉等に利用可能な特定の長さのdsRNAを効率よく生成させる方法並びにRNA合成の促進方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、Dicerの機能ドメインを解析し、長鎖のdsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質を見出した。また、核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質の共存下でdsRNAにdsRNA分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さのdsRNAを効率よく調製できること、さらに当該核酸結合活性を有するタンパク質がdsRNA合成に代表されるRNA合成反応においてもその効率を向上させることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明の第1の発明は、dsRNA分解活性を有するタンパク質であって、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成する活性を有することを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質に関する。

本発明の第1の発明において、dsRNA分解活性を有するタンパク質は、Dicerの機能ドメインを有することが好ましく、例えば、RNase IIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるものが好ましい。また、本発明の第1の発明のタンパク質を用いることにより、特定の長さのdsRNAが約15～30塩基対のdsRNAを生成させることができる。また本発明の第1の発明のタンパク質としては、dsRNA分解活性を有するタンパク質が配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列あるいは配列表の配列番号3記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質が例示される。あるいは、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、本発明の第1の発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることができる。さらに本発明の第1の発明のタンパク質は、コンポーネントとしてキットに含有させることができる。

## 【0010】

本発明の第2の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でdsRNAにdsRNA分解活性を有するタンパク質を作用させ、特定の長さのdsRNAを生成することを特徴とするdsRNAの分解方法に関する。

本発明の第2の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、核酸結合活性を有するタンパク質は、RNA結合活性を有するタンパク質であっても良い。当該RNA結合活性を有するタンパク質は、コールド ショック プロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBが例示される。

本発明の第2の発明の方法により、特定の長さのdsRNAが、約15～30塩基対のdsRNAを生成することができる。さらに、本発明の第2の発明において、dsRNA分解活性を有するタンパク質は、本発明の第1の発明のタンパク質であっても良いし、天然型Dicerあるいはその機能的同等物であっても良い。

## 【0011】

本発明の第3の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でRNA合成活性を有するタンパク質を用いてRNA合成反応を行うことを特徴とするRNAの合成方法に関する。

本発明の第3の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、当該核酸結合活性を有するタンパク質は、コールド ショック プロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBが例示される。さらに、RNA合成活性を有するタンパク質はDNA依存性RNAポリメラーゼであってもよい。

## 【0012】

本発明の第4の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びにdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

## 【0013】

本発明の第5の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

## 【0014】

本発明の第6の発明は、本発明の第3の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

## 【0015】

本発明の第7の発明は、本発明の第3の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

## 【発明の効果】

## 【0016】

本発明により、特定の長さのdsRNAを調製できるdsRNA分解活性を有するタンパク質が提供される。さらに本発明により、RNA干渉等に利用できる特定の長さのdsRNAを効率よく生成させることができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0017】

本明細書においてDicerとは、RNAiの初期段階で長鎖のdsRNAをsiRNAにプロセッシングできる機能を有するタンパク質のことを言う。天然型のDicerとしては、とくに限定はされないが例えばN末端側よりATP結合ドメイン、RNAヘリカ

ーゼドメイン、機能未知なPAZドメイン、RNase IIIa及びbドメイン、さらにdsRNA結合ドメインから構成されているものが挙げられる。

【0018】

本明細書において、Dicerの機能ドメインとは、長鎖dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成できる活性に関与する領域をコードする部位のことを言う。

【0019】

上記機能ドメインとしては、特に限定はされないが例えば、RNase IIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインからなるものが例示される。当該RNase IIIa、bドメインは、Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p5875-5885に記載のように、2本鎖RNAに特異的に作用し、5'末端にリン酸基をもつ特定の鎖長のオリゴヌクレオチドを生成させる活性に関与する領域をコードする部位であっても良い。さらに、dsRNA結合ドメインは、2本鎖RNAに特異的に結合する活性をコードする部位であっても良い。

【0020】

本明細書においてdsRNAとは、RNA干渉の対象となるmRNAと該mRNAに相補的な塩基配列を有するRNAとの2本鎖構造を形成したRNAのことを言う。

また、本明細書においてdsRNAの分解反応による生成物の応用例としては、主に以下に示すsiRNAがある。

【0021】

本明細書において特定の長さのdsRNAとは、特に限定はされないが例えば、約10～100塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAのことを言う。さらに、約15～30塩基対の範囲中の特定の長さ、特に20～25塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAであっても良い。これらのdsRNAは、siRNAとして使用できる。

【0022】

本明細書において核酸結合活性を有するタンパク質とは、一本鎖または二本鎖のDNA、RNAに結合する活性を有するタンパク質のことを言う。当該タンパク質としては、核酸の二次構造を解消する機能を有するものが好ましく、例えば、DNAヘリカーゼ、RNAヘリカーゼあるいはその機能的同等物が挙げられる。

【0023】

本明細書において低温誘導性ベクターとは、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターのことを言い、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

【0024】

本明細書においてコールド ショック プロテインとは、本来の生育条件よりも低温になるような状況下でその温度低下により刺激されて発現されるタンパク質の総称を言う。

【0025】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質、該タンパク質の製造方法ならびに該タンパク質を含有するキット

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成することができる。当該dsRNA分解活性を有するタンパク質としては、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば特に限定はなく、例えば、Dicerの機能ドメインを有するタンパク質が例示される。当該Dicerの機能ドメインは、RNase IIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質であっても良い。また、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば、そのタンパク質の由来は問わない。

当該RNase IIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインは、特に限定はされないが例えばヒト由来Dicerの場合、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列のN末端側のアミノ酸1271～1924（配列表の配列番号2記載の塩基配列番号3811～5772）を有するものが挙げられる。例えば、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配



列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質(Dicer変異体)あるいは配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号13記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質(Dicer変異体)が例示される。

本発明のタンパク質は、特に限定はされないが例えば、長鎖dsRNAを分解し、RNA干渉に有効なsiRNAを生成させることができる。

また、上記機能を有する範囲であれば上記アミノ酸配列あるいは塩基配列において、一ないしは複数個のアミノ酸あるいは塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加されたものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。

特に限定はされないが、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列(例えば、Perfect DB配列等)、発現タンパク質精製のタグ配列(例えば、His tag配列等)、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列(例えば、Factor Xa配列等)などのアミノ酸配列を付加したものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列を有するdsRNA分解活性を有するタンパク質が挙げられる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、長鎖のdsRNAを特定の長さのdsRNAにすることができる。すなわち、本発明においては使用するdsRNA分解活性を有するタンパク質を選択することにより、所望の特定の長さのdsRNAを調製することができる。当該特定の長さのdsRNAは、特に限定はされないが例えば、約10~100塩基対の範囲、好ましくは約15~30塩基対の範囲、特に好ましくは約20~25塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAが例示される。

さらに、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えばDicer変異体は、pH8.5以上のトリス塩酸緩衝液中で塩化マグネシウムの存在下で保存することにより、4℃保存ならびに-20℃保存のいずれの場合においてもその活性を長期間安定に保持することができる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、下記(2)に記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態であっても良い。特に限定はされないが、上記Dicer変異体と核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質が例示される。

#### 【0026】

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造するためのベクターには、特に限定はなく、市販のベクター、発現系のいずれもが使用できる。特に、限定はされないが例えばpETシステム(ノバジェン社製)を用いることができる。さらに、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターが好適に使用でき、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

本発明の製造方法の一態様としては、上記Dicer変異体を低温で機能し得るプロモーターを有するベクター、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターで製造する方法が例示される。

すなわち、本発明の製造方法においては、特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を保持できるタンパク質を発現できるベクターであればいずれもが好適に使用できる。

また、当該特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を最終的に保持できるタンパク質を得られるならば、タンパク質発現時は封入体の形態であるがその後のリホールディング操作により当該機能を回復できるものを発現できるベクターも含まれる。

本発明の方法の一態様、例えば上記Dicer変異体を製造する場合においては、従来のヒト由来Dicerの全長を発現させた場合に比較して、生産量が向上し、さらに当該タンパク質の活性保持体の取得率も向上させることができる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法においては、下記(2)に

記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態で発現させる方法も含まれる。

#### 【0027】

(2) 本発明の核酸結合活性を有するタンパク質による dsRNA の分解の促進方法並びに当該タンパク質を用いた RNA 合成促進方法

本発明の特定の長さの dsRNA を生成することを特徴とする dsRNA 分解の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパク質としては、結果的に dsRNA 分解活性を促進するものであれば特に限定はなく、例えば、上記 RNA 結合活性を有するタンパク質等が好適に使用できる。

当該 RNA 結合活性を有するタンパク質としては特に限定はないが、コールド ショック プロテイン (Csp: cold shock protein) が例示される。特に常温域で機能し得るコールド ショック プロテインが好適に使用でき、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテインが好ましい。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号 9 記載のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 10 記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列) を有するサーモトガ マリティマ (Thermotoga maritima) 由来の CspB タンパク質が好適に使用できる。

当該 CspB タンパク質を dsRNA 分解活性を有するタンパク質と組み合わせることにより、当該 dsRNA 分解活性を促進させることができる。さらに本発明の方法は、上記 (1) 記載の特定の長さの dsRNA を生成させる dsRNA 分解活性を有するタンパク質、例えば Dicer 変異体、天然型 Dicer あるいは市販のリコンビナント Dicer のような機能的同等物のいずれにおいてもその特定の長さの dsRNA を生成させる活性を促進できる。

さらに、本発明の方法においては、当該核酸結合活性を有するタンパク質、例えば RNA 合成活性を有するタンパク質は、dsRNA 分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態のものであってもよい。

#### 【0028】

一方、本発明の RNA 合成の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパク質としては、結果的に RNA 合成活性を有するタンパク質の RNA 合成活性を促進するものであれば特に限定はなく、核酸結合活性を有するタンパク質、コールド ショック プロテイン (Csp: cold shock protein) が好適に使用できる。当該コールド ショック プロテインは、特に限定はされないが好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のものが好適に使用できる。当該コールド ショック プロテインとしては特に限定はされないが、配列表の配列番号 9 記載のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 10 記載の塩基配列) を有するサーモトガ マリティマ (Thermotoga maritima) 由来の CspB タンパク質が例示される。

当該 CspB タンパク質を RNA 合成系に共存させることにより、例えば RNA ポリメラーゼの RNA 合成活性を促進させることができる。当該タンパク質は、生成物が一本鎖あるいは二本鎖 RNA のいずれの場合においても、その合成活性を促進することができる。

#### 【0029】

さらに、本発明の RNA 合成の促進方法は、長鎖 dsRNA のみならず、短鎖 dsRNA、例えば siRNA の合成に利用することができる。当該 siRNA 合成においては、特に限定はされないが T7 RNA ポリメラーゼ等を用いて、好ましくは約 15~30 塩基対、特に好ましくは約 20~25 塩基対のものを合成する際に利用できる。

#### 【0030】

さらに本発明の方法においては、核酸結合活性を有するタンパク質が RNA 合成活性を有するタンパク質による dsRNA の合成ならびに dsRNA 分解活性を有するタンパク質の dsRNA 分解の二つの反応を促進するため、特に RNA 干渉において重要な dsRNA の合成ならびに siRNA の生成系に利用することができる。この場合、各タンパク質は別個であってよいし、融合タンパク質の形態であってよい。

## 【0031】

## (3) 本発明の方法に使用される組成物

本発明の組成物は、特定の長さの dsRNA に分解する反応及び／又は RNA の合成反応を効率よく行うための組成物である。

当該組成物は、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン (Csp: cold shock protein) が好適に使用でき、配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列(配列表の配列番号10記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列)を有するサーモトガ マリティマ (Thermotoga maritima) 由来の CspB タンパク質が好ましい。

## 【0032】

本発明の組成物には、dsRNA 分解活性を有するタンパク質及び／又は RNA 合成活性を有するタンパク質を含んでいてもよい。特定の長さの dsRNA を生成し得る dsRNA 分解活性を有するタンパク質としては、Dicer の機能ドメインを有するものが好ましく、例えば、RNase IIIa、b ならびに dsRNA 結合ドメインからなるタンパク質が好適に使用できる。特に限定はされないが例えば、上記(1)記載の Dicer 変異体、天然型 Dicer あるいは、市販のリコンビナント Dicer のような機能的同等物のいずれであってもよい。当該 Dicer 変異体を含む組成物としては、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。また、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。

上記 dsRNA 分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列(例えば、Perfect DB 配列等)、発現タンパク質精製用のタグ配列(例えば、His tag 配列等)、あるいは発現タンパク質の N 末端側の付加配列を除去するための配列(例えば、Factor Xa 配列等)などのアミノ酸配列を付加したタンパク質であってもよい。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列を有する dsRNA 分解活性を有するタンパク質が挙げられる。さらに、本発明の組成物には、上記(1)記載の Dicer 変異体を安定化させるための緩衝液を含んでいてもよい。

## 【0033】

さらに、RNA 合成活性を有するタンパク質としては、例えば T7 RNA ポリメラーゼ、T3 RNA ポリメラーゼ、SP6 RNA ポリメラーゼ等が好適に使用できる。

さらに本発明の組成物の別態様としては、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA 結合活性を有するタンパク質と特定の長さの dsRNA を生成し得る dsRNA 分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び／又は核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

本発明の組成物は、特定の長さの dsRNA への効率の良い分解及び／又は一本鎖あるいは二本鎖 RNA の合成反応を簡便に行なうことができる。

## 【0034】

また、本発明の組成物の一態様としては、長鎖 dsRNA のみならず、短鎖 dsRNA、例えば siRNA の合成に利用することができる組成物が挙げられる。当該組成物は、約 10～100 塩基対、好ましくは約 15～30 塩基対、特に好ましくは約 20～25 塩基対の dsRNA を合成する際に有効である。

## 【0035】

## (4) 本発明の方法に使用されるキット

本発明の方法に使用されるキットは、特定の長さの dsRNA に分解する反応及び／又

はRNAの合成反応を効率よく行うためのキットである。

当該キットは、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン(Csp: cold shock protein)が好適に使用でき、配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ マリティマ(Thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質が好適に使用できる。

#### 【0036】

本発明のキットには、特定の長さのdsRNAを生成する活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質及び／又はRNA合成活性を有するタンパク質を含んでいてもよい。該dsRNA分解活性を有するタンパク質及び／又はRNA合成活性を有するタンパク質としては、上記(3)で挙げられたものが好適に使用できる。さらに、本発明のキットには、上記(1)記載のDicer変異体を安定化させるための緩衝液を含んでいてもよい。

さらに本発明のキットの別態様としては、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質と特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び／又は核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

さらに、本発明のキットには、上記以外のコンポーネント、例えば反応の結果生成された特定の長さのdsRNAを精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。特に限定はされないが例えば、約21塩基対のsiRNAを精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。

本発明のキットを用いることで、特定の長さのdsRNAへの効率の良い分解及び／又はRNAの合成を簡便に行なうことができる。

#### 【0037】

また本発明のキットの一態様としては、長鎖dsRNAのみならず、短鎖dsRNA、例えばsiRNAの合成に利用することができるキットが挙げられる。当該キットは、約10～100塩基対、好ましくは約15～30塩基対、特に好ましくは約20～25塩基対のdsRNAを合成する際に有効である。

#### 【実施例】

#### 【0038】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス(T. Maniatis)ら編集、モレキュラー クローニング: ア ラボラトリー マニュアル第2版(Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.)に記載の方法によった。

#### 【0039】

実施例1 ヒト由来DicerのRNase IIIドメインの発現

##### (1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号1記載のヒト由来Dicer アミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸1271～1924(塩基番号3811～5772)よりなるポリペプチドを発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号5及び6記載の塩基配列を有する合成プライマー1及び2をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー1は、制限酵素KpnIの認識配列を塩基番号9～14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1271～1277に相当する塩基配列を塩基番号16～36にもつ合成DNAで

ある。また、合成プライマー 2 は、制限酵素 *HindIII* の認識配列を塩基番号 9 ~ 14 に、さらにヒト由来 *Dicer* のアミノ酸配列 (配列番号 1) のアミノ酸番号 1919 ~ 1924 に相当する塩基配列を塩基番号 18 ~ 36 にもつ。

#### 【0040】

上記合成プライマーを用いて、PCR を行った。PCR の反応条件を以下に示す。

すなわち、鋳型 DNA (ヒト cDNA ライブラリー、Human Pancreas、タカラバイオ社製)  $2\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{l}$  の  $10\times\text{LA PCR buffer}$  (タカラバイオ社製)、 $5\mu\text{l}$  の dNTP 混合液 (タカラバイオ社製)、 $10\text{pmol}$  の合成プライマー 1、 $10\text{pmol}$  の合成プライマー 2、 $0.5\text{U}$  の Takara LA Taq (タカラバイオ社製) を加え、滅菌水を加えて全量を  $50\mu\text{l}$  とした。前記反応液を TaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ社製) にセットし、 $94^{\circ}\text{C}$  1 分、 $55^{\circ}\text{C}$  1 分、 $72^{\circ}\text{C}$  3 分を 1 サイクルとする 30 サイクルの反応を行なった。

#### 【0041】

反応終了後、該反応液  $5\mu\text{l}$  を  $1.0\%$  アガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約  $2\text{kbp}$  の DNA フラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収 DNA を  $5\mu\text{l}$  の滅菌水に懸濁し、制限酵素 *KpnI* (タカラバイオ社製) 及び制限酵素 *HindIII* (タカラバイオ社製) で 2 重消化し、 $1.0\%$  アガロース電気泳動によりその *KpnI-HindIII* 消化物を抽出精製し、*KpnI-HindIII* 消化 DNA 断片を得た。

#### 【0042】

次に国際公開第 99/27117 号パンフレットの実施例 1 ~ 6 記載の方法に従い、pCold08NC2 ベクターを調製した。

次に上記 pCold08 ベクターを上記 *KpnI-HindIII* 消化 DNA 断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記 *KpnI-HindIII* 消化 DNA 断片と混合し、DNA ライゲーションキット (タカラバイオ社製) を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液  $20\mu\text{l}$  を用いて大腸菌 JM109 を形質転換し、その形質転換体を  $1.5\%$  (w/v) 濃度の寒天を含む LB 培地 (アンピシリン  $50\mu\text{g/ml}$  含む) 上で生育させた。

#### 【0043】

目的の DNA 断片が挿入されたプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、この組み換えプラスミドを pCold08 hDi-R とした。当該プラスミドは、p1asmid pCold08 hDi-R と命名、表示され、平成 15 年 8 月 11 日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566)) に FERM P-19482 として寄託されている。この pCold08 hDi-R は、ヒト由来 *Dicer* アミノ酸配列 (配列番号 1) のアミノ酸番号 1271 ~ 1924 のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、Perfect DB 配列、His tag 配列、並びに Factor Xa 配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号 12 に、塩基配列を配列表の配列番号 13 に示す。

#### 【0044】

(2) 発現、精製及び各種 buffer 条件でのサンプル調製

上記 (1) で調製した pCold08 hDi-R を用いて大腸菌 BL21 を形質転換し、その形質転換体を  $1.5\%$  (w/v) 濃度の寒天を含む LB 培地 (アンピシリン  $50\mu\text{g/ml}$  含む) 上で生育させた。生育したコロニーを  $2.5\text{ml}$  の LB 液体培地 (アンピシリン  $50\mu\text{g/ml}$  含む) に植菌し、 $37^{\circ}\text{C}$  で一晚培養した。この一部を  $100\text{ml}$  の同 LB 培地に植菌し、 $37^{\circ}\text{C}$  で対数増殖期まで培養した。前記培養後、 $15^{\circ}\text{C}$  に保温したインキュベーター内で 10 分間振とうした後、IPTG を終濃度  $1.0\text{mM}$  になるように添加し、そのまま  $15^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離に

より集め、5mlの細胞破碎溶液[50mM トリシュー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、1%Triton(トライトン)X-100、1mM ジチオスレイトール、2mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離(11,000rpm 20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

#### 【0045】

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして1ml分のNi-NTA agarose(キアゲン社製)にbuffer A[20mM トリシュー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100]を10ml添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1mlの樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約5mlの上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂をφ15mmのカラムに充填し、5mlのbuffer Aで2回洗浄した。次に5mlのbuffer B[20mM トリシュー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]で樹脂を洗浄後、5mlのbuffer C[20mM トリシュー塩酸緩衝液(pH7.5)、800mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]、続いて5mlのbuffer Bで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

#### 【0046】

洗浄後、3mlのbuffer D[20mM トリシュー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、100mM イミダゾール]で溶出操作を行った。次に、500mlのbuffer E[50mM トリシュー塩酸緩衝液(pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、0.1%トリティンX-100、1mM ジチオスレイトール]で透析を行ない、その後、セントリコン(アミコン社製)を用いて約10倍まで濃縮を行なった。この精製濃縮サンプルの一部について10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、分子量約76,800のところに目的タンパク質のバンドが確認された。さらに、当該サンプルについてAnti His HRP Conjugate(キアゲン社製)を用い、その添付プロトコルに従って抗Hisタグ抗体を用いたウエスタンブロットティング検出を行なったところ、目的のタンパク質バンドが発色検出された。

#### 【0047】

さらに上記方法ではbuffer Dでの溶出後、buffer E(これをタンパク質サンプルIとする)で透析を行なっているが、タンパク形状緩衝液の条件設定のため、以下の組成の緩衝液での透析も同様にして実施した。

1: buffer Fを用いた透析[50mM トリシュー塩酸緩衝液(pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トリティンX-100、1mM ジチオスレイトール]→タンパク質サンプルII

2: buffer Gを用いた透析[50mM トリシュー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トリティンX-100、1mM ジチオスレイトール]→タンパク質サンプルIII

3: buffer Hを用いた透析[50mM トリシュー塩酸緩衝液(pH8.8)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トリティンX-100、1mM ジチオスレイトール]→タンパク質サンプルIV

#### 【0048】

実施例2 dsRNA分解活性の測定

##### (1) 反応液の調製

上記実施例1-(2)で調製したタンパク質サンプルI~IVについてそのDicer



活性を測定した。当該活性測定は以下のようにして行った。

まず、活性測定に用いた基質となるdsRNAは、TurboScript T7 Transcription kit (GTS社製)を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。

すなわち、プラスミドpQBI125 (Quantum Biotechnologies Inc. 社製)に挿入されているRed-shift Green Fluorescent Protein (以下GFPと略称する)をコードする遺伝子(配列表の配列番号11)について、プラスミドpDON-AI (タカラバイオ社製)に挿入したpDON-rsGFPを鋳型とし、配列表の配列番号7記載のT7プロモーター配列をもった合成プライマー3と配列表の配列番号8記載の合成プライマー4を用いてPCRを行い、増幅産物を得た。次に得られた2本鎖DNAを鋳型として、T7 RNA polymerase (タカラバイオ社製)によるRNA合成反応により約700bpの長さのdsRNAを調製した。

#### 【0049】

上記方法で調製したdsRNA 1 $\mu$ g、上記(2)で調製したタンパク質サンプル 1 $\mu$ l、10mM ATP溶液 1 $\mu$ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 1 $\mu$ l、5 $\times$ 反応緩衝液(それぞれ最終透析に用いた緩衝液の5倍濃縮したもの) 2 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。

#### 【0050】

また、市販のDicer (GTS社製)の場合は、Dicer酵素液2 $\mu$ l、基質となるdsRNA 1 $\mu$ g、10mM ATP溶液 1 $\mu$ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 0.5 $\mu$ l、付属の反応緩衝液 4 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。

#### 【0051】

以上の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ Cで17時間反応後、5 $\mu$ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。電気泳動後にエチジウムブロマイド染色したゲルより、約21ヌクレオチドの分解産物の確認されたものを活性有とした。

#### 【0052】

##### (2) 活性測定

上記(1)で調製した反応液の活性測定を行い、RNase IIIドメインタンパク質への影響を検討した。さらに、各緩衝液中における安定性についても検討するため、精製直後のサンプルを用いた場合と、4 $^{\circ}$ C及び-20 $^{\circ}$ C条件で5日間保存したサンプルを用いた。その結果、特にタンパク質サンプルIII、タンパク質サンプルIVにおいては、4 $^{\circ}$ C保存ならびに-20 $^{\circ}$ C保存のいずれの場合においても市販Dicerと同じ大きさの約21ヌクレオチドの分解産物が確認され、その活性を安定に保持していることが確認できた。

#### 【0053】

以上のことから、ヒト由来DicerのRNase IIIドメインタンパク質は、pH 8.5以上のトリス-塩酸緩衝液中、塩化マグネシウムが存在する条件で保存することで活性を安定化できることが判明した。

#### 【0054】

実施例3 dsRNA生産及び分解に寄与する因子の検討

(1) dsRNA生産及び分解に寄与する因子を検討するために、常温域で核酸結合活性を有するタンパク質について検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質は入手が困難であった。従って、配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ マリティマ (Thermotoga maritima) 由来のCspBタンパク質をモデルタンパク質として用いた。当該タンパク質は、プロテイン サイエンス (Protein Science) 第8巻、394-403頁(1999)記載の方法で調製した。

## 【0055】

(2) サーモトガ・マリティマ由来CspBのdsRNA分解への効果

CspBを添加した形でのdsRNA分解活性は以下のように測定した。

すなわち、hDicerを酵素として用いた場合、実施例1-(2)で調製したタンパク質サンプル(酵素液) 1 $\mu$ l、上記(1)で調製したCspB溶液 1 $\mu$ l、基質となるdsRNA 1 $\mu$ g、10mM ATP溶液 1 $\mu$ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 1 $\mu$ l、5 $\times$ 反応緩衝液[250mM トリス塩酸(pH8.5)、500mM 塩化ナトリウム、0.5% Triton X-100、5mM DTT) 2 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて、容量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。また市販のDicer(GTS社製)の場合は、酵素液2 $\mu$ l、CspB溶液 1 $\mu$ l、基質となるdsRNA 1 $\mu$ g、10mM ATP溶液 1 $\mu$ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 0.5 $\mu$ l、付属の反応緩衝液 4 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて、容量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。

## 【0056】

添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で9.2ng/ $\mu$ l、18.4ng/ $\mu$ l、92ng/ $\mu$ lになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1 $\mu$ l添加した。

## 【0057】

以上の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ Cで17時間反応後、5 $\mu$ lを15%ポリアクリルアミド電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い切断産物を確認した。さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11(Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行った。その結果、市販Dicer及びRNase IIIドメインタンパク質のいずれの場合においてもCspB添加によるdsRNAの分解量の向上が確認できた。特に9.2ng/ $\mu$ lの前後で分解量が向上することが確認できた。

## 【0058】

すなわち、CspBを反応液中に添加することで、市販のDicer、RNase IIIドメインタンパク質のいずれにおいてもdsRNA分解産物がより多く得られることが明らかとなった。

## 【0059】

(3) サーモトガ・マリティマ由来CspBのRNA合成への効果

RNAiにおいては、dsRNAを合成するためにRNA合成系の活性を促進することも重要であるとの見地に基づき、サーモトガ・マリティマ由来CspBのRNA合成への効果を検討した。モデル系として、T7 RNAポリメラーゼ系を選択した。RNA合成系への影響については以下のようにして行った。すなわち、CspBを添加した形でのT7 RNAポリメラーゼによる転写量を目安とした。常法により調製したT7プロモーターを有するpET16b(ノバジェン社製)に配列表の配列番号11記載の塩基配列を有するrsGFP遺伝子を導入したプラスミドを鋳型DNAとして1 $\mu$ g、10 $\times$ T7 RNAポリメラーゼ用緩衝液(タカラバイオ社製) 2 $\mu$ l、50mM DTT 2 $\mu$ l、RNaseインヒビター(タカラバイオ社製) 0.4 $\mu$ l、25mM NTP 2 $\mu$ l、T7 RNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製) 1 $\mu$ l、CspB溶液 1 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて容量を20 $\mu$ lとしたものを反応液とし、37 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。なお本実施例でCspBタンパク質の濃度は終濃度で90ng/ $\mu$ l、180ng/ $\mu$ l、460ng/ $\mu$ l、920ng/ $\mu$ lになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1 $\mu$ l添加した。

反応後のサンプル2 $\mu$ lに、10 $\times$ MOPS緩衝液(200mM MOPS、50mM 酢酸ナトリウム、10mM EDTA、10mM EGTA) 2 $\mu$ l、ホルムアルデヒド 2 $\mu$ l、脱イオン化ホルムアミド 9 $\mu$ l及びnuclease free水 3 $\mu$ lを添加して70 $^{\circ}$ C、10分間保温し、その後水中で1分間インキュベートした。これ



に10×loading buffer 2 $\mu$ lを添加して、1×MOPS緩衝液中でエチジウムブロマイドを含む1.25%アガロースゲルを用いて電気泳動解析を行なった。そのゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、T7 RNAポリメラーゼによって合成されたmRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が460 ng/ $\mu$ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約2倍以上に、さらに920 ng/ $\mu$ l添加した場合は約3倍になることが確認できた。

#### 【0060】

(4) サーモトガ・マリティマ由来CspBのdsRNA合成への効果

次にサーモトガ・マリティマ由来CspBのdsRNA合成に対する影響について検討した。本実施例においては、実施例2-(1)で調製したdsRNA合成用鋳型を利用した。RNAへの転写については、市販のTurboScript T7 Transcription kit (ジーンセラピーシステムズ社製)を用いて、その添付プロトコルに従った。なお、この際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/ $\mu$ l、180 ng/ $\mu$ l、460 ng/ $\mu$ l、920 ng/ $\mu$ lになるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1 $\mu$ l添加した。37℃、4時間反応後に1 $\mu$ lのDNase Iを添加し、37℃で15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液1 $\mu$ lをエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルを上記(3)と同様の方法でT7 RNAポリメラーゼによって合成されたdsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920 ng/ $\mu$ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約2倍以上なることが確認できた。

#### 【0061】

上記実施例と同様に別態様のT7 RNAポリメラーゼ転写系についても検討した。すなわち、実施例2-(1)で調製したdsRNA合成用鋳型1 $\mu$ g、10×T7 RNAポリメラーゼ緩衝液(タカラバイオ社製) 1 $\mu$ l、50mM DTT 1 $\mu$ l、RNAseインヒビター(タカラバイオ社製) 0.2 $\mu$ l、25mM NTP 1 $\mu$ l、T7 RNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製) 0.5 $\mu$ l、CspB溶液 1 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて容量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とし、37℃で4時間反応させた。なおこの際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/ $\mu$ l、180 ng/ $\mu$ l、460 ng/ $\mu$ l、920 ng/mlになるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1 $\mu$ l添加した。反応後のサンプルにDNase I(タカラバイオ社製)を0.5 $\mu$ l加えて、37℃で15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液1 $\mu$ lをエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルについてもdsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920 ng/ $\mu$ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約3倍以上なることが確認できた。

#### 【0062】

以上のように、CspBを反応液中に添加することで、T7 RNAポリメラーゼによる転写産物がより多く得られることが明らかとなった。この効果は、1本鎖RNA合成ならびに2本鎖RNA合成のいずれの場合においても確認できた。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0063】

本発明により特定の長さのdsRNAを生成するdsRNA分解活性を有するタンパク質が提供される。また、本発明の方法によりRNA干渉等において有用な、特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び/又はRNA合成促進方法が提供される。さらに本発明の特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び/又はRNA合成促進方法を簡便に実施

することができる組成物ならびにキットが提供される。

【配列表フリーテキスト】

【0064】

SEQ ID NO:5; Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer

SEQ ID NO:6; Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer

SEQ ID NO:7; Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

SEQ ID NO:8; Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; TAKARA BIO INC.

&lt;120&gt; The protein which has dsRNA decomposition activity, the dsRNA decomposition method and the RNA synthesis method using the protein which has nucleic acid binding activity

&lt;130&gt; T-1847

&lt;160&gt; 13

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1924

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met	Lys	Ser	Pro	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Ser	Met	Ala	Gly	Leu	Gln	Leu
1				5				10					15		

Met	Thr	Pro	Ala	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Pro	Phe	Phe	Gly	Leu	Pro	Trp
			20					25					30		

Gln	Gln	Glu	Ala	Ile	His	Asp	Asn	Ile	Tyr	Thr	Pro	Arg	Lys	Tyr	Gln
		35					40					45			

Val	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Ala	Leu	Asp	His	Asn	Thr	Ile	Val	Cys	Leu
		50				55					60				

Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Phe	Ile	Ala	Ser	Thr	Thr	Leu	Leu	Lys
65					70					75				80	

Ser	Cys	Leu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Arg	Asn	Gly	Lys
				85					90					95	

Arg	Thr	Val	Phe	Leu	Val	Asn	Ser	Ala	Asn	Gln	Val	Ala	Gln	Gln	Val
				100					105				110		

Ser Ala Val Arg Thr His Ser Asp Leu Lys Val Gly Glu Tyr Ser Asn  
115 120 125

Leu Glu Val Asn Ala Ser Trp Thr Lys Glu Arg Trp Asn Gln Glu Phe  
130 135 140

Thr Lys His Gln Val Leu Ile Met Thr Cys Tyr Val Ala Leu Asn Val  
145 150 155 160

Leu Lys Asn Gly Tyr Leu Ser Leu Ser Asp Ile Asn Leu Leu Val Phe  
165 170 175

Asp Glu Cys His Leu Ala Ile Leu Asp His Pro Tyr Arg Glu Phe Met  
180 185 190

Lys Leu Cys Glu Ile Cys Pro Ser Cys Pro Arg Ile Leu Gly Leu Thr  
195 200 205

Ala Ser Ile Leu Asn Gly Lys Trp Asp Pro Glu Asp Leu Glu Glu Lys  
210 215 220

Phe Gln Lys Leu Glu Lys Ile Leu Lys Ser Asn Ala Glu Thr Ala Thr  
225 230 235 240

Asp Leu Val Val Leu Asp Arg Tyr Thr Ser Gln Pro Cys Glu Ile Val  
245 250 255

Val Asp Cys Gly Pro Phe Thr Asp Arg Ser Gly Leu Tyr Glu Arg Leu  
260 265 270

Leu Met Glu Leu Glu Glu Ala Leu Asn Phe Ile Asn Asp Cys Asn Ile  
275 280 285

Ser Val His Ser Lys Glu Arg Asp Ser Thr Leu Ile Ser Lys Gln Ile  
290 295 300

Leu Ser Asp Cys Arg Ala Val Leu Val Val Leu Gly Pro Trp Cys Ala  
305 310 315 320

Asp Lys Val Ala Gly Met Met Val Arg Glu Leu Gln Lys Tyr Ile Lys  
325 330 335

His Glu Gln Glu Glu Leu His Arg Lys Phe Leu Leu Phe Thr Asp Thr  
340 345 350

Phe Leu Arg Lys Ile His Ala Leu Cys Glu Glu His Phe Ser Pro Ala  
355 360 365

Ser Leu Asp Leu Lys Phe Val Thr Pro Lys Val Ile Lys Leu Leu Glu  
370 375 380

Ile Leu Arg Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Arg His Ser Phe Glu Ser Val  
385 390 395 400

Glu Trp Tyr Asn Asn Arg Asn Gln Asp Asn Tyr Val Ser Trp Ser Asp  
405 410 415

Ser Glu Asp Asp Asp Glu Asp Glu Glu Ile Glu Glu Lys Glu Lys Pro  
420 425 430

Glu Thr Asn Phe Pro Ser Pro Phe Thr Asn Ile Leu Cys Gly Ile Ile  
435 440 445

Phe Val Glu Arg Arg Tyr Thr Ala Val Val Leu Asn Arg Leu Ile Lys  
450 455 460

Glu Ala Gly Lys Gln Asp Pro Glu Leu Ala Tyr Ile Ser Ser Asn Phe  
465 470 475 480

Ile Thr Gly His Gly Ile Gly Lys Asn Gln Pro Arg Asn Asn Thr Met  
485 490 495

Glu Ala Glu Phe Arg Lys Gln Glu Glu Val Leu Arg Lys Phe Arg Ala  
500 505 510

His Glu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Thr Ser Ile Val Glu Glu Gly Val  
515 520 525

Asp Ile Pro Lys Cys Asn Leu Val Val Arg Phe Asp Leu Pro Thr Glu  
530 535 540

Tyr Arg Ser Tyr Val Gln Ser Lys Gly Arg Ala Arg Ala Pro Ile Ser  
545 550 555 560

Asn Tyr Ile Met Leu Ala Asp Thr Asp Lys Ile Lys Ser Phe Glu Glu  
565 570 575

Asp Leu Lys Thr Tyr Lys Ala Ile Glu Lys Ile Leu Arg Asn Lys Cys  
580 585 590

Ser Lys Ser Val Asp Thr Gly Glu Thr Asp Ile Asp Pro Val Met Asp  
595 600 605

Asp Asp His Val Phe Pro Pro Tyr Val Leu Arg Pro Asp Asp Gly Gly  
610 615 620

Pro Arg Val Thr Ile Asn Thr Ala Ile Gly His Ile Asn Arg Tyr Cys  
625 630 635 640

Ala Arg Leu Pro Ser Asp Pro Phe Thr His Leu Ala Pro Lys Cys Arg  
645 650 655

Thr Arg Glu Leu Pro Asp Gly Thr Phe Tyr Ser Thr Leu Tyr Leu Pro  
660 665 670

Ile Asn Ser Pro Leu Arg Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys  
675 680 685

Val Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu  
690 695 700

His Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu  
705 710 715 720

Thr Val Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr  
725 730 735

Ser Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro  
740 745 750

Lys Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln  
755 760 765

Pro Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro  
770 775 780

Asp Glu Leu Asn Phe Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr  
785 790 795 800

Thr Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro  
805 810 815

His Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu  
820 825 830

Leu Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile  
835 840 845

Thr Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys  
850 855 860

Pro Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val  
865 870 875 880

Leu Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe  
885 890 895

Lys Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro  
900 905 910

Ser Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp  
915 920 925

Tyr Gln Asp Ala Val Ile Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro  
930 935 940

His Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser  
945 950 955 960

Lys Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr  
965 970 975

Lys Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val  
980 985 990

Asp His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn  
995 1000 1005

Gln Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys  
1010 1015 1020

Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu  
1025 1030 1035

Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala  
1040 1045 1050

Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr  
1055 1060 1065

Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly  
1070 1075 1080

Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe  
1085 1090 1095

Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser  
1100 1105 1110



Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr  
1115 1120 1125

Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr Ser  
1130 1135 1140

Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu  
1145 1150 1155

Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp  
1160 1165 1170

Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn  
1175 1180 1185

Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln  
1190 1195 1200

Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser  
1205 1210 1215

Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro  
1220 1225 1230

Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn  
1235 1240 1245

Ala Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met  
1250 1255 1260

Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp  
1265 1270 1275

Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly  
1280 1285 1290

Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala  
 1295 1300 1305

Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser  
 1310 1315 1320

Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro  
 1325 1330 1335

Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val  
 1340 1345 1350

Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro  
 1355 1360 1365

Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp Leu  
 1370 1375 1380

Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys  
 1385 1390 1395

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly  
 1400 1405 1410

Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser  
 1415 1420 1425

Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp  
 1430 1435 1440

Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met  
 1445 1450 1455

Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro  
 1460 1465 1470

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys  
 1475 1480 1485

Ser Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe  
1490 1495 1500

Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys  
1505 1510 1515

Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser  
1520 1525 1530

Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr  
1535 1540 1545

Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp  
1550 1555 1560

Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu  
1565 1570 1575

Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu  
1580 1585 1590

Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr  
1595 1600 1605

Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser Cys  
1610 1615 1620

Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp  
1625 1630 1635

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp  
1640 1645 1650

His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe  
1655 1660 1665

Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala  
1670 1675 1680

Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr  
1685 1690 1695

Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile  
1700 1705 1710

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln  
1715 1720 1725

His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn  
1730 1735 1740

Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys  
1745 1750 1755

Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp  
1760 1765 1770

Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp  
1775 1780 1785

Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp  
1790 1795 1800

Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala  
1805 1810 1815

Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp  
1820 1825 1830

Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser  
1835 1840 1845

Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu  
1850 1855 1860

Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly  
1865 1870 1875

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys  
1880 1885 1890

Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg  
1895 1900 1905

Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn  
1910 1915 1920

Ser

<210> 2

<211> 5772

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgaaaagcc ctgctttgca acccctcagc atggcaggcc tgcagctcat gaccctgct      60
tcctcaccaa tgggtccttt ctttggactg ccatggcaac aagaagcaat tcatgataac      120
atttatacgc caagaaaata tcaggttgaa ctgcttgaag cagctctgga tcataatacc      180
atcgtctgtt taaacactgg ctcaggggaag acatttattg ctagtactac tctactaaag      240
agctgtctct atctagatct aggggagact tcagctagaa atggaaaaag gacggtgttc      300
ttggtcaact ctgcaaacca ggttgctcaa caagtgtcag ctgtcagaac tcattcagat      360
ctcaaggttg gggaatactc aaacctagaa gtaaattgcat cttggacaaa agagagatgg      420
aaccaagagt ttactaagca ccaggttctc attatgactt gctatgtcgc cttgaatgtt      480
ttgaaaaatg gttacttata actgtcagac attaaccttt tgggtgttga tgagtgtcat      540
cttgcaatcc tagaccaccc ctatcgagaa tttatgaagc tctgtgaaat ttgtccatca      600
tgtcctcgca ttttgggact aactgcttcc attttaaatg ggaaatggga tccagaggat      660

```

ttggaagaaa agtttcagaa actagagaaa attcttaaga gtaatgctga aactgcaact 720  
gacctggtgg tcttagacag gtatacttct cagccatgtg agattgtggt ggattgtgga 780  
ccatttactg acagaagtgg gctttatgaa agactgctga tggaattaga agaagcactt 840  
aattttatca atgattgtaa tatactctga cattcaaaag aaagagattc tactttaatt 900  
tcgaaacaga tactatcaga ctgtcgtgcc gtattggtag ttctgggacc ctggtgtgca 960  
gataaagtag ctggaatgat ggtaagagaa ctacagaaat acatcaaaca tgagcaagag 1020  
gagctgcaca ggaaatTTTT attgtttaca gacactttcc taaggaaaat acatgcacta 1080  
tgtgaagagc acttctcacc tgcctcactt gacctgaaat ttgtaactcc taaagtaatc 1140  
aaactgctcg aaatcttacg caaatataaa ccatatgagc gacacagttt tgaaagcgtt 1200  
gagtgggtata ataatagaaa tcaggataat tatgtgtcat ggagtgattc tgaggatgat 1260  
gatgaggatg aagaaattga agaaaaagag aagccagaga caaatTTTcc ttctcctttt 1320  
accaacattt tgtgcggaat tatttttgtg gaaagaagat acacagcagt tgtcttaaac 1380  
agattgataa aggaagctgg caaacaagat ccagagctgg cttatatcag tagcaatttc 1440  
ataactggac atggcattgg gaagaatcag cctcgcaaca acacgatgga agcagaattc 1500  
agaaaacagg aagaggtact taggaaattt cgagcacatg agaccaacct gcttattgca 1560  
acaagtattg tagaagaggg tgttgatata ccaaaatgca acttgggtgg tctttttgat 1620  
ttgcccacag aatatcgatc ctatgttcaa tctaaaggaa gagcaagggc acccatctct 1680  
aattatataa tgtagcgga tacagacaaa ataaaaagt ttgaagaaga ccttaaaacc 1740  
tacaagcta ttgaaaagat cttgagaaac aagtgttcca agtcggttga tactggtgag 1800  
actgacattg atcctgtcat ggatgatgat cacgttttcc caccatatgt gttgaggcct 1860  
gacgatggtg gtccacgagt cacaatcaac acggccattg gacacatcaa tagatactgt 1920  
gctagattac caagtgatcc gtttactcat ctagctccta aatgcagaac ccgagagttg 1980  
cctgatggta cattttattc aactctttat ctgccaatta actcacctct tcgagcctcc 2040  
attgttggtc caccaatgag ctgtgtacga ttggctgaaa gagttgtcgc tctcatttgc 2100  
tgtgagaaac tgcacaaaat tggcgaactg gatgaccatt tgatgccagt tgggaaagag 2160

actgttaa atgaagagga gcttgatttg catgatgaag aagagaccag tgttccagga 2220  
agaccagggt ccacgaaacg aaggcagtgc tacccaaaag caattccaga gtgtttgagg 2280  
gatagttatc ccagacctga tcagccctgt tacctgtatg tgataggaat ggttttaact 2340  
acacctttac ctgatgaact caactttaga aggcggaagc tctatcctcc tgaagatacc 2400  
acaagatgct ttggaatact gacggccaaa cccatactc agattccaca ctttcctgtg 2460  
tacacacgct ctggagagggt taccatatcc attgagttga agaagtctgg tttcatgttg 2520  
tctctacaaa tgcttgagtt gattacaaga cttcaccagt atatattctc acatattctt 2580  
cggcttgaaa aacctgcact agaatttaaa cctacagacg ctgattcagc atactgtgtt 2640  
ctacctctta atgttggtta tgactccagc actttggata ttgactttta attcatggaa 2700  
gatattgaga agtctgaagc tcgcataggc attcccagta caaagtatac aaaagaaaca 2760  
ccctttgttt ttaaattaga agattaccaa gatgccgtta tcattccaag atatcgcaat 2820  
tttgatcagc ctcatcgatt ttatgtagct gatgtgtaca ctgatcttac ccactcagt 2880  
aaatttcctt cccctgagta tgaaactttt gcagaatatt ataaaacaaa gtacaacctt 2940  
gacctaacca atctcaacca gccactgctg gatgtggacc acacatcttc aagacttaat 3000  
cttttgacac ctcgacattt gaatcagaag gggaaagcgc ttcctttaag cagtgtgag 3060  
aagaggaaag ccaaattgga aagtctgcag aataaacaga tactggttcc agaactctgt 3120  
gctatacatc caattccagc atcactgtgg agaaaagctg tttgtctccc cagcatactt 3180  
tatgccttc actgcctttt gactgcagag gagctaagag cccagactgc cagcgatgct 3240  
ggcgtgggag tcagatcact tcctgcggat ttagatacc ctaacttaga cttcgggtgg 3300  
aaaaaatcta ttgacagcaa atctttcatc tcaatttcta actcctcttc agctgaaaat 3360  
gataattact gtaagcacag cacaattgtc cctgaaaatg ctgcacatca aggtgcta at 3420  
agaacctcct ctctagaaaa tcatgaccaa atgtctgtga actgcagaac gttgctcagc 3480  
gagtcctctg gtaagctcca cgttgaagtt tcagcagatc ttacagcaat taatggtctt 3540  
tcttacaatc aaaatctcgc caatggcagt tatgatttag ctaacagaga cttttgccaa 3600  
ggaaatcagc taaattacta caagcaggaa ataccgtgc aaccaactac ctcatattcc 3660

attcagaatt tatacagtta cgagaaccag cccagccca gcgatgaatg tactctcctg 3720  
agtaataaat accttgatgg aaatgctaac aaatctacct cagatggaag tcctgtgatg 3780  
gccgtaatgc ctggtacgac agacactatt caagtgtca agggcaggat ggattctgag 3840  
cagagccctt ctattgggta ctctcaagg actcttggcc ccaatcctgg acttattctt 3900  
caggctttga ctctgtcaaa cgctagtgat ggatttaacc tggagcggct tgaaatgctt 3960  
ggcgactcct ttttaagca tgccatcacc acatatctat tttgactta ccctgatgcg 4020  
catgagggcc gcctttcata tatgagaagc aaaaaggcca gcaactgtaa tctgtatcgc 4080  
cttgaaaaa agaagggact acccagccgc atgggtggtg caatatttga tccccctgtg 4140  
aattggcttc ctcttggtta tgtagtaa caagacaaa gcaacacaga taaatgggaa 4200  
aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcatgctg gcgaatggca aactggatga ggattacgag 4260  
gaggaggatg aggaggagga gagcctgatg tggagggctc cgaaggaaga ggctgactat 4320  
gaagatgatt tcctggagta tgatcaggaa catatcagat ttatagataa tatgttaatg 4380  
gggtcaggag cttttgtaaa gaaaatctct ctttctcctt tttcaaccac tgattctgca 4440  
tatgaatgga aaatgccc aaatcctcc ttaggtagta tgccattttc atcagatttt 4500  
gaggattttg actacagctc ttgggatgca atgtgctatc tggatcctag caaagctgtt 4560  
gaagaagatg actttgtggt ggggttctgg aatccatcag aagaaaactg tgggtgtgac 4620  
acgggaaaagc agtccatttc ttacgacttg cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc 4680  
atagcggact gtgtggaagc cctgctgggc tgctatttaa ccagctgtgg ggagagggct 4740  
gctcagcttt tcctctgttc actggggctg aagggtgctcc cggtaatata aaggactgat 4800  
cgggaaaagg ccctgtgccc tactcgggag aatttcaaca gccacaaaa gaacctttca 4860  
gtgagctgtg ctgctgcttc tgtggccagt tcacgtctt ctgtattgaa agactcggaa 4920  
tatggttggt tgaagattcc accaagatgt atgtttgatc atccagatgc agataaaaca 4980  
ctgaatcacc ttatatcggg gtttgaaaat ttgaaaaga aaatcaacta cagattcaag 5040  
aataaggctt accttctcca ggcttttaca catgcctcct accactacaa tactatcact 5100  
gattgttacc agcgcttaga attcctggga gatgcgattt tggactacct cataaccaag 5160



cacctttatg aagacccgcg gcagcactcc ccgggggtcc tgacagacct gcggtctgcc 5220  
ctggtcaaca acaccatctt tgcatcgctg gctgtaaagt acgactacca caagtacttc 5280  
aaagctgtct ctctgagct cticcatgtc attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag 5340  
aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa 5400  
gaagaggata ttgaagttcc aaaggccatg ggggataatt ttgagtcgct tgctgggtgcc 5460  
atttacctgg atagtgggat gtcactggag acagtctggc aggtgtacta tcccatgatg 5520  
cggccactaa tagaaaagtt ttctgcaa atgtacccgtt cccctgtgcg agaattgctt 5580  
gaaatggaac cagaaactgc caaatitagc ccggctgaga gaacttacga cgggaaggtc 5640  
agagtcactg tggaagtagt aggaaagggg aaatttaaag gtgttggtcg aagttacagg 5700  
attgccaaat ctgcagcagc aagaagagcc ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag 5760  
gttcccaata gc 5772

<210> 3

<211> 1962

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 3

caagtgtca agggcaggat ggattctgag cagagccctt ctattgggta ctctcaagg 60  
actcttgccc ccaatcctgg acttattctt caggctttga ctctgtcaaa cgctagtgat 120  
ggatttaacc tggagcggct tgaaatgctt ggcgactcct ttttaaagca tgccatcacc 180  
acatatctat ttgtcactta ccctgatgcg catgagggcc gcctttcata tatgagaagc 240  
aaaaagggtca gcaactgtaa tctgtatcgc cttaggaaaa agaagggact acccagccgc 300  
atgggtggtgt caatatttga tccccctgtg aattggcttc ctcttggtta ttagtaaat 360  
caagacaaaa gcaacacaga taaatgggaa aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcatgctg 420  
gcgaatggca aactggatga ggattacgag gaggaggatg aggaggagga gagcctgatg 480  
tggagggctc cgaaggaaga ggctgactat gaagatgatt tcctggagta tgatcaggaa 540

catatcagat ttatagataa tatgttaatg gggtcaggag cttttgtaaa gaaaatctct 600  
ctttctcctt tttcaaccac tgattctgca tatgaatgga aaatgcccac aaaatcctcc 660  
ttaggtagta tgccattttc atcagatttt gaggattttg actacagctc ttgggatgca 720  
atgtgctatc tggatcctag caaagctgtt gaagaagatg actttgtggt ggggttctgg 780  
aatccatcag aagaaaactg tgggtgttgac acgggaaagc agtccatttc ttacgacttg 840  
cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc atagcggact gtgtggaagc cctgctgggc 900  
tgctatttaa ccagctgtgg ggagagggct gctcagcttt tcctctgttc actggggctg 960  
aaggtgctcc cggtaatata aaggactgat cgggaaaagg ccctgtgccc tactcgggag 1020  
aatttcaaca gccacaacaa gaacctttca gtgagctgtg ctgctgcttc tgtggccagt 1080  
tcacgctctt ctgtattgaa agactcggaa tatgggtgtt tgaagattcc accaagatgt 1140  
atgtttgatc atccagatgc agataaaaca ctgaatcacc ttatatcggg gtttgaaaat 1200  
tttgaaaaga aaatcaacta cagattcaag aataaggctt accttctcca ggcttttaca 1260  
catgcctcct accactacaa tactatcact gattgttacc agcgcttaga attcctggga 1320  
gatgcgattt tggactacct cataaccaag cacctttatg aagacccgcg gcagcactcc 1380  
ccgggggtcc tgacagacct gcggtctgcc ctggtcaaca acaccatctt tgcacgctg 1440  
gctgtaaagt acgactacca caagtacttc aaagctgtct ctctgagct cttccatgtc 1500  
attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag 1560  
cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa gaagaggata ttgaagttcc aaaggccatg 1620  
ggggatattt ttgagtcgct tgctgggtgcc atttacatgg atagtgggat gtcactggag 1680  
acagtctggc aggtgtacta tcccatgatg cggccactaa tagaaaagtt ttctgcaaat 1740  
gtaccccggt cccctgtgcg agaattgctt gaaatggaac cagaaactgc caaatttagc 1800  
ccggctgaga gaacttacga cgggaaggct agagtcactg tggaagtagt aggaaagggg 1860  
aaatttaaag gtgttggtcg aagttacagg attgccaat ctgcagcagc aagaagagcc 1920  
ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag gttccaata gc 1962

<211> 654  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant.

<400> 4

Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly  
1 5 10 15

Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala  
20 25 30

Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu  
35 40 45

Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe  
50 55 60

Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser  
65 70 75 80

Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly  
85 90 95

Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp  
100 105 110

Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys  
115 120 125

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly Lys  
130 135 140

Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser Leu Met  
145 150 155 160

Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp Phe Leu Glu

165

170

175

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser  
180 185 190

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp  
195 200 205

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met  
210 215 220

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala  
225 230 235 240

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val  
245 250 255

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly  
260 265 270

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp  
275 280 285

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr  
290 295 300

Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu  
305 310 315 320

Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys  
325 330 335

Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser  
340 345 350

Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp  
355 360 365

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His  
370 375 380

Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn  
385 390 395 400

Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu  
405 410 415

Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys  
420 425 430

Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile  
435 440 445

Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu  
450 455 460

Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu  
465 470 475 480

Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu  
485 490 495

Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn  
500 505 510

Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu  
515 520 525

Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe  
530 535 540

Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu  
545 550 555 560

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys

565

570

575

Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met  
580 585 590

Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly  
595 600 605

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly  
610 615 620

Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala  
625 630 635 640

Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser  
645 650

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer

<400> 5

tcgagctcgg tacccaagt gctcaagggc aggatg

36

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer

<400> 6

tatctagaaa gcttttagct attgggaacc tgaggt

36

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 7

gggtaatacag actcactata gggagaatgg ctagcaaagg ag

42

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 8

gggtaatacag actcactata gggagatcag ttgtacagtt ca

42

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> Thermotoga maritima

<400> 9

Met	Arg	Gly	Lys	Val	Lys	Trp	Phe	Asp	Ser	Lys	Lys	Gly	Tyr	Gly	Phe
1				5					10					15	

Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Val	His	Trp	Ser	Ala	Ile
			20					25					30		

Glu	Met	Glu	Gly	Phe	Lys	Thr	Leu	Lys	Glu	Gly	Gln	Val	Val	Glu	Phe
		35					40					45			

Glu	Ile	Gln	Glu	Gly	Lys	Lys	Gly	Pro	Gln	Ala	Ala	His	Val	Lys	Val
	50					55					60				

Val	Glu
65	

<210> 10  
<211> 198  
<212> DNA  
<213> *Thermotoga maritima*

<400> 10  
atgagaggaa aggttaagt gttcgattcc aagaagggt acggattcat cacaaaggac 60  
gaaggaggag acgtgttcgt aacttggtca gccatcgaaa tggaaggttt caaaactctg 120  
aaggaaggcc aggtcgtcga gttcgagatt caggaaggca agaaaggtcc acaggcagcg 180  
cacgtgaaag tagttgag 198

<210> 11  
<211> 720  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> A gene encoding red-shifted green fluorescence protein.

<400> 11  
atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 60  
ggtgatgta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac 120  
ggaaaactta cctgaagtt catctgcact actggcaaac tgccctgttc atggccaaca 180  
ctagtcacta ctctgtgcta tgggtgttcaa tgcttttcaa gatacccga tcatatgaaa 240  
cggcatgact tttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc 300  
ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 360  
gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggaaacat tctgggacac 420  
aaattggaat acaactataa ctacacaaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat 480  
ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca 540  
gaccattatc acaaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 600  
tacctgtcca cacaatctgc cctttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660  
cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaactga 720

<210> 12



<211> 675  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 12

Met Asn His Lys Val His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn  
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln  
 20 25 30

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly  
 35 40 45

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn  
 50 55 60

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile  
 65 70 75 80

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu  
 85 90 95

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu  
 100 105 110

Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp  
 115 120 125

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys  
 130 135 140

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met  
 145 150 155 160

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu

165

170

175

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn  
195 200 205

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro  
210 215 220

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser  
225 230 235 240

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr  
245 250 255

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu  
260 265 270

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys  
275 280 285

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu  
290 295 300

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu  
305 310 315 320

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu  
325 330 335

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg  
340 345 350

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys  
355 360 365

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser  
370 375 380

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg  
385 390 395 400

Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile  
405 410 415

Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn  
420 425 430

Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn  
435 440 445

Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile  
450 455 460

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His  
465 470 475 480

Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr  
485 490 495

Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys  
500 505 510

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe  
515 520 525

Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg  
530 535 540

Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala  
545 550 555 560

Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser

565

570

575

Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg  
 580 585 590

Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg  
 595 600 605

Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu  
 610 615 620

Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys  
 625 630 635 640

Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala  
 645 650 655

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val  
 660 665 670

Pro Asn Ser  
 675

<210> 13  
 <211> 2025  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 13  
 atgaatcaca aagtgcacatca tcatcatcat catatcgaag gtaggaattc gagctcggta 60  
 cccaagtgc tcaagggcag gatggattct gagcagagcc cttctattgg gtactcctca 120  
 aggactcttg gcccacatcc tggacttatt cttcaggctt tgactctgtc aaacgctagt 180  
 gatggattta acctggagcg gcttgaaatg cttggcgact cttttttaaa gcatgccatc 240  
 accacatata tattttgcac ttaccctgat gcgcatgagg gccgcctttc atatatgaga 300

agcaaaaagg tcagcaactg taatctgtat cgccttggaa aaaagaaggg actaccacagc 360  
cgcatggtgg tgtcaatatt tgatccccct gtgaattggc ttcctcctgg ttatgtagta 420  
aatcaagaca aaagcaacac agataaatgg gaaaaagatg aaatgacaaa agactgcatg 480  
ctggcgaatg gcaaactgga tgaggattac gaggaggagg atgaggagga ggagagcctg 540  
atgtggaggg ctccgaagga agaggctgac tatgaagatg atttcctgga gtatgatcag 600  
gaacatatca gatttataga taatatgtta atggggctcag gagcttttgt aaagaaaatc 660  
tctctttctc ctttttcaac cactgattct gcatatgaat ggaaaatgcc caaaaaatcc 720  
tccttaggta gtatgccatt ttcatacagat tttgaggatt ttgactacag ctcttgggat 780  
gcaatgtgct atctggatcc tagcaaagct gttgaagaag atgactttgt ggtgggggttc 840  
tggaatccat cagaagaaaa ctgtggtgtt gacacgggaa agcagtccat ttcttacgac 900  
ttgcacactg agcagtgtat tgctgacaaa agcatagcgg actgtgtgga agccctgctg 960  
ggctgctatt taaccagctg tggggagagg gctgctcagc ttttcctctg ttactgggg 1020  
ctgaagggtgc tcccggtaat taaaaggact gatcgggaaa aggccctgtg ccctactcgg 1080  
gagaatttca acagccaaca aaagaacctt tcagtgaagct gtgctgctgc ttctgtggcc 1140  
agttcacgct cttctgtatt gaaagactcg gaatatgggt gtttgaagat tccaccaaga 1200  
tgtatgtttg atcatccaga tgcagataaa aactgaatc acctatatc ggggtttgaa 1260  
aattttgaaa agaaaatcaa ctacagattc aagaataagg ctaccttct ccaggctttt 1320  
acacatgcct cctaccacta caatactatc actgattgtt accagcgctt agaattcctg 1380  
ggagatgcga ttttggacta cctcataacc aagcaccttt atgaagacc gcggcagcac 1440  
tccccggggg tcctgacaga cctgcggtct gccctgggtca acaacacat ctttgcacg 1500  
ctggctgtaa agtacgacta ccacaagtac ttcaaagctg tctctcctga gctcttccat 1560  
gtcattgatg actttgtgca gtttcagctt gagaagaatg aaatgcaagg aatggattct 1620  
gagcttagga gatctgagga ggatgaagag aaagaagagg atattgaagt tccaaaggcc 1680  
atgggggata tttttgagtc gcttgctggg gccatttaca tggatagtgg gatgtcactg 1740  
gagacagtct ggcagggtga ctatcccatg atgcggccac taatagaaaa gttttctgca 1800

aatgtacccc gttcccctgt gcgagaattg cttgaaatgg aaccagaaac tgccaaattt 1860  
agcccggctg agagaactta cgacgggaag gtcagagtca ctgtggaagt agtaggaaag 1920  
gggaaattta aaggtgttgg tcgaagttac aggattgcca aatctgcagc agcaagaaga 1980  
gccctccgaa gcctcaaagc taatcaacct caggttccca atagc 2025

## 【書類名】要約書

## 【要約】

## 【課題】

特定の長さの dsRNA を生成させる活性を有する、dsRNA 分解活性を有するタンパク質の提供、RNA 干渉等に利用可能な特定の長さの dsRNA を効率よく生成させる方法並びに RNA 合成の促進方法を提供すること。

## 【解決手段】

長鎖の dsRNA に作用して特定の長さの dsRNA を生成させる活性を有する、dsRNA 分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質、例えば RNA 結合活性を有するタンパク質の共存下で dsRNA に dsRNA 分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さの dsRNA を効率よく調製できる方法及び当該核酸結合活性を有するタンパク質が dsRNA 合成に代表される RNA 合成反応においてもその効率を向上させる方法。

【選択図】           なし

特願 2 0 0 3 - 2 9 3 5 5 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 2 0 1 9 2 4 5 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 4 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号

氏 名

タカラバイオ株式会社